

VU Research Portal

Invariant Natural Killer T cells and Vy9V82-T cells:

Schneiders, F.L.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Schneiders, F. L. (2015). *Invariant Natural Killer T cells and Vy9V82-T cells: between in-betweeners*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

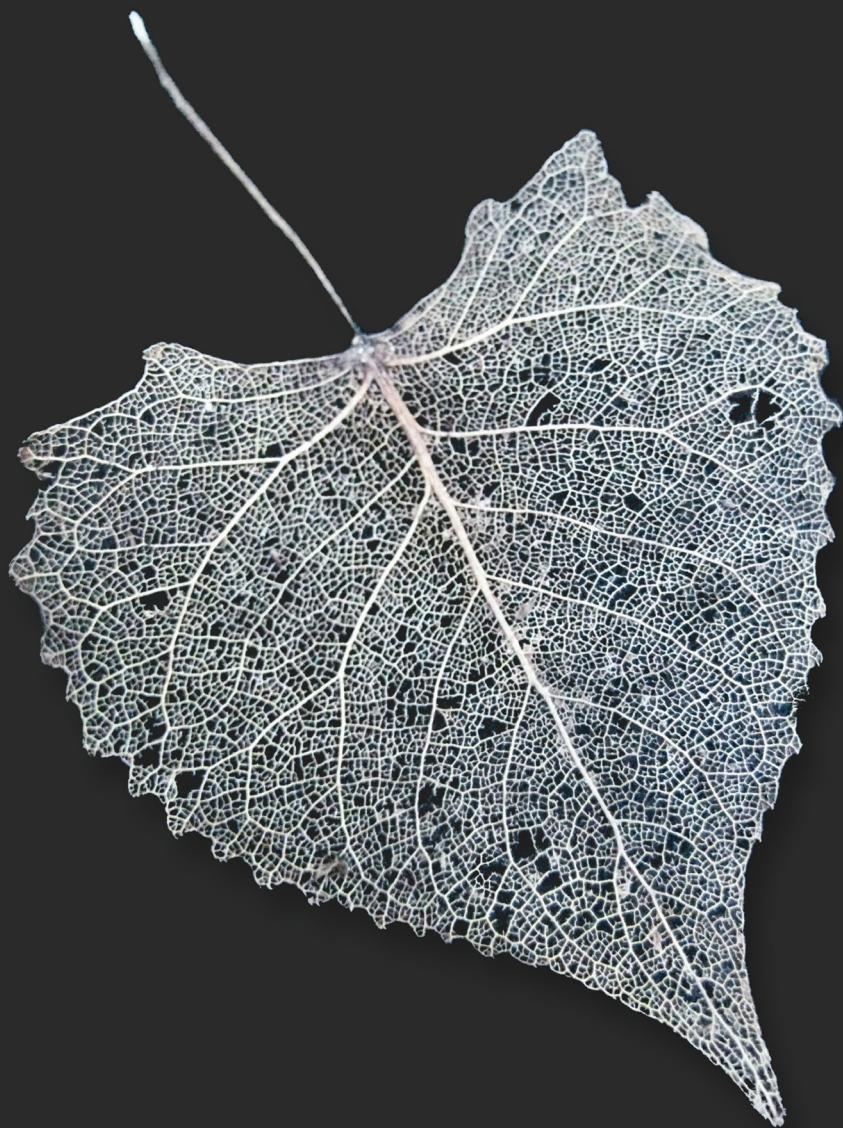
- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



NL

Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift richt zich op twee unieke typen witte bloedcellen die een belangrijke rol spelen in de afweer tegen tumoren; iNKT cellen en Vy9Vδ2-T-cellen. iNKT cellen hebben kenmerken van zowel T- als NK-cellen. Het T cel receptor (TCR) repertoire van iNKT cellen is zeer beperkt en herkent uitsluitend antigenen gepresenteerd door een monomorf CD1d antigeen presenterend molecuul (1,2). Dankzij de productie van een flexibel cytokine-profiel kunnen iNKT cellen een cruciale rol spelen in diverse typen immuun reacties, waaronder antitumorale reacties. Als immuun regulerende cellen vormen iNKT cellen een brug tussen het zogenaamde 'aangeboren' en 'adaptieve' immuunsysteem en creëren een micro-milieu waarin immuun responsen worden gevormd (2,3). Door deze kenmerken kan het manipuleren van iNKT cellen een waardevolle therapeutische benadering zijn.

Vy9Vδ2-T-cellen zijn het meest voorkomende type γδ-T cellen in het perifere bloed en spelen een evidente rol in anti-tumor immuun responsen (4). Zij kunnen worden geactiveerd en geëxpandeerd door fosfoantigenen (pAg). Aminobisfosfonaten (NBP) stimuleren de intracellulaire ophoping van endogene pAg door remming van het mevalonaat metabolisme en induceren conformationele veranderingen van het eiwit CD277 (BTN3A1), wat Vy9Vδ2-T-cel activatie en celdeling stimuleert. (5) Na stimulatie verwerven de Vy9Vδ2-T-cellen het vermogen om kwaadaardige cellen van diverse solide tumoren te vernietigen. Tevens produceren Vy9Vδ2-T-cellen verschillende cytokines en chemokines waarmee zij andere cellen reguleren en zijn ze in staat om antigenen aan αβ T cellen te presenteren. De talrijke aanwezigheid van deze populatie in het bloed en het grote anti-tumor potentieel in *in vitro* experimenten rechtvaardigt verder onderzoek ter verbetering van de antitumorale effecten van Vy9Vδ2-T-cellen bij patiënten.

Het feit dat iNKT en Vy9Vδ2-T-cellen klinisch relevant zijn gebleken bij diverse tumortypen (6-9) heeft het klinische onderzoek met witte bloedcellen verder gestimuleerd. Therapeutische manipulatie van zowel iNKT cellen als Vy9Vδ2-T cellen heeft bij patiënten immunologische, biochemische en zelfs klinische responsen laten zien, zonder dat sprake was van relevante bijwerkingen. Echter, het ontbreekt vooralsnog aan consistentie in de klinische resultaten. Verschillende factoren kunnen hierbij een rol spelen. Zo kunnen bijvoorbeeld het geringe aantal iNKT cellen in patiënten met kanker, het ontstaan van anergie na intraveneuze antigeen stimulatie en de omstandigheden van het tumor micro-milieu bepalend zijn voor de uitkomst van de antitumorale immuunrespons.

In dit proefschrift hebben wij diverse aspecten van iNKT cellen, Vy9Vδ2-T-cellen en hun interacties bestudeerd in een poging meer inzicht te krijgen in communicatie tussen deze unieke lymfocyten en het effect van deze

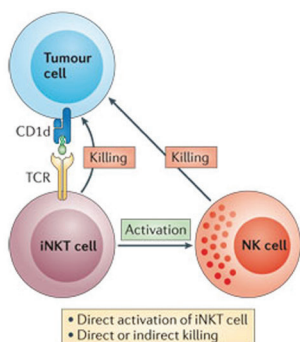
interactie op het antitumor potentieel van deze cellen. Tevens exploreerden we nieuwe therapeutische benaderingen om de antitumorale functies van deze cellen in patiënten met kanker te verbeteren (samengevat in figuur 1).

De beste klinische en preklinische resultaten met het iNKT cel activerende ligand α -GalCer zijn verkregen bij belading van α -GalCer op dendritische cellen (DC) (10–12). Zoals beschreven in *hoofdstuk 3* hebben we protocollen ontwikkeld en geoptimaliseerd voor het genereren van met α -GalCer beladen immature en mature van monocyt-afgeleide DC (moDC) van perifere bloed die zorg kunnen dragen voor een optimale inductie van iNKT cel activatie en cytokine productie. Aangezien directe ligatie van CD1d met monoklonale antilichamen tot een Th1-gereguleerde immuunrespons leidt, werd deze methode ook beschreven.

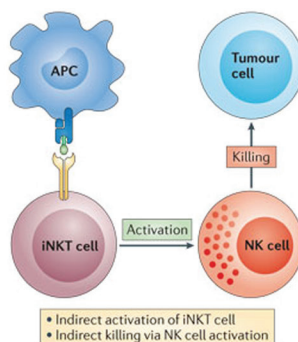
In *hoofdstuk 4* presenteren we de bijgewerkte analyse van een studie waarin is gekeken naar het effect van het aantal circulerende iNKT cellen op de klinische uitkomst van patiënten met hoofd-halskanker (HNSCC) die behandeld werden met op genezing gerichte radiotherapie. Voorafgaand aan de radiotherapie werd hierbij in een groep van 47 patiënten het aantal iNKT cellen in het bloed gemeten. Met een mediane follow-up tijd van 8,7 jaar toont deze studie aan dat patiënten met HNSCC en een ernstig tekort aan iNKT cellen een opvallend slechtere klinische uitkomst hebben, met betrekking tot overleving, ziekte specifieke overleving en locoregionale controle, ten opzichte van patiënten zonder dit tekort. Bovendien is het voordeel in overleving van patiënten met intermediaire/hoge iNKT cel aantallen niet gerelateerd aan de aan- of afwezigheid van een HPV-infectie. Aangezien de correlatie tussen een laag aantal intra-tumorale iNKT cellen en slechte prognose ook is gevonden bij patiënten met een neuroblastoom (8) en bij darmkanker (9), zou de voorspellende waarde van iNKT cellen een meer algemeen fenomeen kunnen zijn, en benadrukt dit, ondanks hun kleine aantallen, de belangrijke rol van deze cellen in de regulatie van anti-tumor immuun reacties.

Diverse studies zijn verricht naar interacties tussen iNKT cellen en andere typen afweercellen zoals NK-, T- en myeloïde cellen, met betrekking tot de immuunreactie tegen kanker (zie figuur 1). Tezamen tonen deze studies diverse directe en indirecte manieren waarop iNKT cellen kunnen bijdragen aan de antitumor afweer reactie en aan het tegengaan van de door de tumor veroorzaakte onderdrukking van het immuunsysteem. In tegenstelling tot bovenstaande is er relatief weinig bekend over interacties tussen iNKT cellen en Vy9V δ 2-T-cellen en of deze cellen elkaar wederzijds kunnen moduleren. In *hoofdstuk 5* hebben wij onderzocht of de antitumorale activiteit van Vy9V δ 2-T cellen kan worden versterkt door iNKT cellen. We zagen dat activatie van iNKT

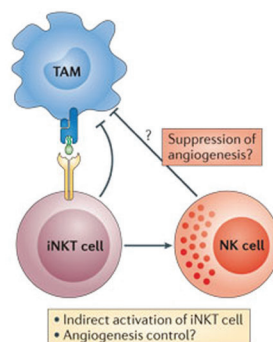
a CD1d⁺ tumour cell



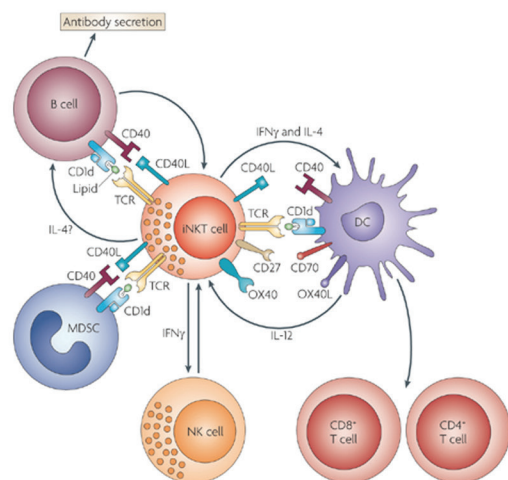
b CD1d⁻ tumour cell



C Tumour-associated macrophage



d Natural killer T cells interactions



Figuur 1: Overzicht van directe en indirecte antitumorale effecten van iNKT cellen en mechanismen voor interactie tussen iNKT en andere myeloïde en lymfoïde immuun effector subtypen, resulterend in een afname van immuun suppressie en het stimuleren van antitumorale immuniteit. Overgenomen uit (13,14).

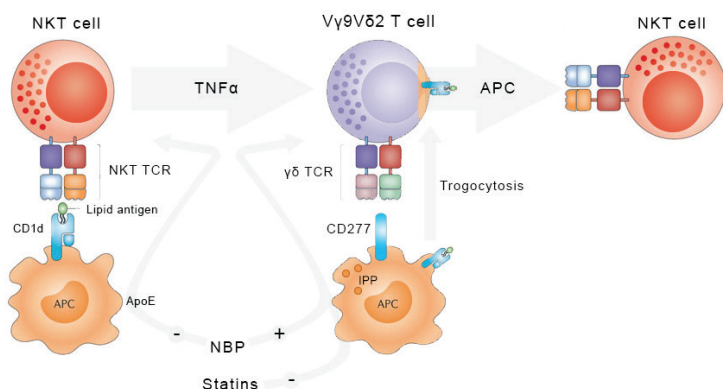
cellen met behulp van α -GalCer resulteerde in een verhoogde activatie van met pAg-gestimuleerde Vy9V δ 2-T cellen. Gelijktijdige activatie van iNKT cellen stimuleerde tevens de IFN- γ -productie, alsmede het cytolytische potentieel van Vy9V δ 2-T cellen tegen tumorcellen. Het versterkende effect van iNKT cellen op Vy9V δ 2-T cel activatie wordt gemedieerd door

productie van TNF- α . Deze observaties hebben geleid tot een uitbreiding van het spectrum van immuun cellen waarvan bekend is dat ze worden beïnvloed worden door iNKT cellen en hebben aangetoond dat deze interactie kan bijdragen aan het versterken van de antitumorreactie.

Zoals beschreven in *hoofdstuk 2*, hebben klinische studies met α -GalCer-behandelde moDC geleid tot incidentele antitumorale reacties in patiënten met vergevorderde tumoren. Er zijn echter diverse praktische barrières die klinische toepassing van de behandeling met α -GalCer-behandelde moDC belemmeren. Aangezien Vy9V δ 2-T-cellen de mogelijkheid hebben professionele antigeen-presenterende capaciteiten te verwerven na activatie door pAg (15,16), hebben wij in *hoofdstuk 6* hun vermogen tot (glycolipide) antigeen presentatie ten opzichte van iNKT cellen bestudeerd. Vy9V δ 2-T APC bleken inderdaad in staat α -GalCer te presenteren aan iNKT cellen en die te activeren. De glycolipiden werden echter niet gepresenteerd via nieuw, door geactiveerde Vy9V δ 2-T cellen aangemaakte CD1d moleculen, maar door CD1d moleculen die door middel van de opname (trogocytose) van CD1d-bevattende membraan fragmenten door Vy9V δ 2-T-cellen onderdeel waren geworden van het celoppervlak. Alhoewel met α -GalCer beladen moDC de Vy9V δ 2-T APC cellen onmiskenbaar overtroffen als antigeen presenterend celtype voor iNKT cellen, hebben Vy9V δ 2-T cellen het voordeel van een snellere ontwikkeling naar een antigeen presenterende cel en zijn ze talrijker in bloed dan de voorlopercellen van moDC. Daarnaast hebben iNKT cellen die geactiveerd zijn door Vy9V δ 2-T cellen een meer pro-inflammatoir (Th1) cytokine profiel dan iNKT cellen die gestimuleerd zijn door moDC. Deze eigenschappen maken het gebruik van Vy9V δ 2-T-cellen interessant voor toekomstige klinische studies, zoals wij ook benadrukken in *hoofdstuk 7*.

Vervolgens hebben we de effecten van NBP op glycolipiden-geïnduceerde iNKT activatie *in vitro* onderzocht waarbij een opvallende daling van α -GalCer-geïnduceerde iNKT cel activatie werd gezien als DC werden blootgesteld aan NBP (*hoofdstuk 8*). Deze remmende werking bleek te worden veroorzaakt door een door NBP geïnduceerde afname van de apolipoproteïne E (ApoE) productie door DC, hetgeen een bekende facilitator is van transmembraneus transport van exogeen verkregen glycolipiden door DC. Deze kennis over het remmend vermogen van NBP op glycolipiden-gemedieerde iNKT cel activatie is van belang bij het opzetten van op iNKT cel gebaseerde anti-kanker therapieën, aangezien in de kliniek NBP regelmatig worden voorgeschreven aan patiënten met kanker, bijvoorbeeld bij uitzaaiingen in de botten.

Alhoewel het bekend is dat i.v. toediening van NBP een krachtige systemische Vy9V δ 2-T-cel activatie *in vivo* induceert en dat deze effecten sterk



Figuur 2: Overzicht van de bevindingen van dit proefschrift met betrekking tot de interacties tussen iNKT en Vy9Vδ2-T cellen.

geassocieerd zijn met het ontstaan van een acute fase reactie (APR) als bijwerking, is er geen uitvoerig onderzoek gedaan naar het effect van NBP op de inductie van APC moleculen op circulerende Vy9Vδ2-T-cellen, noch naar het potentieel van behandeling met statines op de remming van Vy9Vδ2-T cel activatie en het vóórkomen van een APR. In *hoofdstuk 9* bevestigen we dat *in vivo* behandeling met NBP Vy9Vδ2-T-cellen stimuleert tot een geactiveerd en Th1 cytokine producerend effector fenotype, en dat dit vergezeld wordt door klinische symptomen van een APR. Circulerende Vy9Vδ2-T cellen verwerven tijdens deze activatie niet de fenotypische kenmerken van een APC. Ondanks het feit dat de behandeling met simvastatine, welke ten minste 1 week vóór de eerste NBP toediening gestart werd, de expressie van perforine, granzyme B en HLA-DR door NBP-geactiveerde Vy9Vδ2-T cellen kon beperken, was simvastatine niet in staat om de ontwikkeling naar een geactiveerd Th1 cytokine producerend effector fenotype te voorkomen, noch was het in staat het ontstaan van APR na NBP-infusie te beperken. Dit matige effect van statines kan mogelijk verklaard worden door een onvolledige remming van het mevalonaat metabolisme bij de doses statines die in onze studie werden gebruikt, mogelijk resulterend in voldoende resterende pAg accumulatie na NBP administratie voor Vy9Vδ2-T cel activatie. Hoewel hogere doses statines doeltreffender zouden kunnen zijn, zou een andere aanpak om APR te voorkomen kunnen bestaan uit een directe blokkade van pAg herkenning door Vy9Vδ2-T-cellen, bijvoorbeeld met behulp van neutraliserende Vy9Vδ2-TCR


specifieke antilichamen. In figuur 2 wordt een overzicht van de bevindingen van dit proefschrift gegeven.

Concluderende opmerkingen

In dit proefschrift hebben we de interacties tussen iNKT en Vγ9Vδ2-T-cellen bestudeerd, en onderzocht hoe deze interacties de afweerreactie van deze cellen kan beïnvloeden. Het feit dat deze cellen elkaar kunnen versterken, biedt kansen nieuwe therapeutische benaderingen te exploreren gericht op iNKT en Vγ9Vδ2-T cellen. Voor een succesvolle anti-tumor behandeling is het essentieel in te spelen op het immuun-suppressieve micro-milieu middels nieuwe of aanvullende strategieën. Het dirigeren van deze invariant T cel subtypen naar de tumor kan hier wellicht aan bijdragen, door de balans in het tumor micro-milieu te verschuiven naar een pro-inflammatoire Th1 type afweerreactie. In de interacties tussen (between) deze cellen die tussen het 'aangeboren' en 'adaptieve' immuunsysteem in zitten (in-betweeners), liggen perspectieven met betrekking tot het verbeteren van de effectiviteit van anti-tumor immunotherapie.

Referenties

1. Van Der Vliet HJ, Molling JW, Von Blomberg BME, Nishi N, Kölgén W, Van Den Eertwegh AJM, et al. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clinical Immunology*. 2004. p. 8–23.
2. Godfrey DI, Kronenberg M. Review series Going both ways : immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1379–88.
3. Wu L, Gabriel CL, Parekh V V., Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: Innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens*. 2009. p. 535–45.
4. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2013;13(2):88–100.
5. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné C-M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human γδ T-cell subset. *Blood*. 2012 Sep 13;120(11):2269–79.
6. Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with Vγ9Vδ2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol*. 2012;160(2):123–32.
7. Schneiders FL, de Bruin RCG, van den Eertwegh AJM, Scheper RJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, et al. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J Clin Oncol*. 2012 Feb 10;30(5):567–70.
8. Metelitsa LS, Wu H-W, Wang H, Yang Y, Warsi Z, Asgharzadeh S, et al. Natural Killer T Cells Infiltrate Neuroblastomas Expressing the Chemokine CCL2. *J Exp Med*. The Rockefeller University Press; 2004;199(9):1213–21.

- 
9. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, et al. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7322–7.
 10. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, et al. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood*. 2004;103(2):383–9.
 11. Chang DH, Osman K, Connolly J, Kukreja A, Krasovsky J, Pack M, et al. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med*. 2005;201(9):1503–17.
 12. Bontkes HJ, Moreno M, Hangalapura B, Lindenberg JJ, de Groot J, Loughheed S, et al. Attenuation of invariant Natural Killer T-cell anergy induction through intradermal delivery of α -galactosylceramide. *Clin Immunol*. 2010;136(3):364–74.
 13. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2012. p. 239–52.
 14. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):28–38.
 15. Moser B, Brandes M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol*. 2006;27(3):112–8.
 16. Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science (80-)*. American Association for the Advancement of Science; 2005;309(5732):264–8.

Nederlandse Samenvatting